

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Simona Sedláčková

PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE ARYLSPIROCYKlickÝCH KOMPLEXŮ BORU

Synthesis and Characterization of Arylspiroborates

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Ivan Jelínek, CSc.

Školitel: RNDr. Martin Štícha, Ph.D.

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 21. května 2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování doc. RNDr. Ivanu Jelínkovi, CSc. a RNDr. Martinu Štíchovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovali.

Seznam zkratek

ASB	arylspirocyclické sloučeniny boru, (Arylspiroborates)
BNCT	borová neutronová záchytová terapie, (Boron Neutron Capture Therapy)
Bu	butyl
Cat	katechol, (1,2-dihydroxybenzene)
CE	kolizní energie, (Collision Energy)
CID	kolizí indukovaná disociace, (Collisionally Induced Dissociation)
DHN	2,3-dihydroxynaftalen, (2,3-dihydroxynaphthalene)
DMSO	dimethylsulfoxid
ESI	ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization)
E_{cm}	těžišťová energie
E_{lab}	kinetická energie udělená iontu
FTSM	hmotnostní spektrometrie s Fourierovou transformací, (Fourier Transform Mass Spectrometry)
HRMS	vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie, (High Resolution Mass Spectrometry)
ICR	iontová cyklotronová rezonance, (Ion Cyclotron Resonance)
PET	pozitronová emisní tomografie, (Positron Emission Tomography)
PG	pyrogallol
Q	kvadrupól, (Quadrupole)
MEC	methoxykatechol, (3-methoxy-1,2-benzendiol)
M_i	hmotnost iontu
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie, (Tandem Mass Spectrometry)
M_t	hmotnost terče
m/z	poměr hmotnosti k náboji
TBC	4-terc-butylkatechol, (4-tert-Butylcatechol)
TOF	průletový analyzátor, (Time of Flight Mass Spectrometry)

Obsah

1. Cíl práce	6
2. Teoretický úvod	7
2. 1. Příprava komplexů boru	7
2. 3. Metabolismus boru a jeho komplexů	9
2. 4. Využití sloučenin boru	10
2. 4. 1. Využití se zaměřením na arylspirocyklické sloučeniny boru	12
2. 4. 1. 1. Biologická aktivita	12
2. 4. 1. 2. Fluorescenční vlastnosti	14
2. 5. Hmotnostní spektrometrie	15
2. 5. 1. Ionizace elektrosprejem (ESI – electrospray ionization)	15
2. 5. 2. Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)	15
2. 5. 3. Kolizní indukovaná disociace	16
3. Experimentální část	17
3. 1. Přístroje	17
3. 2. Použité chemikálie	17
3. 3. Postup	17
3. 4. Podmínky měření	18
4. Diskuze	19
5. Závěr	29
6. Použitá literatura	30

1. Cíl práce

Cílem bakalářské práce je příprava některých komplexů boru s využitím fenolických ligandů (katecholu, pyrogallolu, 3-methoxykatecholu, 2,3-dihydroxynaftalenu a 4-terc-butylkatecholu) a jejich charakterizace s využitím ESI-QqTOF.

2. Teoretický úvod

Arylspirocyklické sloučeniny boru (ASB) byly doposud popsány řadou analytických technik. Za pomoci ^1H -, ^{11}B -, ^{13}C - NMR v přítomnosti dimethylsulfoxidu (DMSO) byly charakterizovány ASB odvozené od kyseliny gallové a pyrogallové [1], 4-terc-butylkatecholu, 3,5-di-tercbutylkatecholu [2], 2,3-dihydroxynaftalenu [3] nebo 4-nitrokatecholu [4]. ^1H - a ^{13}C - NMR byly popsány například u některých halogen substituovaných ASB [5].

První látkou patřící do skupiny ASB popsanou monokrystalickou rentgenovou difrakcí byla draselná sůl arylspiroborátu odvozená od 3,5-Di-terc-Butylkatecholu [2]. Dále byly studovány tetrabutylamonné soli ASB odvozené od kyseliny gallové [1], draselné a tetraethylamonné soli ASB odvozené od 2,3-dihydroxynaftalenu [3] a triethylmethylamonná sůl ASB odvozená od 4-nitrokatecholu [4].

FT-IR byly popsány komplexy s 4-nitrokatecholem [4] nebo také halogen substituované ASB [5].

Hmotnostní spektrometrie, která může do problematiky přinést celou řadu zajímavých podnětů byla zatím v této oblasti výzkumu značně zanedbávána. Za pomoci hmotnostní spektrometrie byly charakterizovány pouze ASB odvozené od katecholu [6]. Z dalších spirocyklických sloučenin boru potom například di a tetra-ferrocenyl spiroborátové komplexy [7]. Studium chování arylspiroborátových komplexů v kolizní cele ani interpretaci takto získaných hmotnostních spekter se dosud nikdo systematicky nevěnoval.

2. 1. Příprava komplexů boru

Bor je unikátním prvkem, který je velkou výzvou nejen pro teoretické chemiky, ale i pro průmyslové chemiky a technology. Možná s výjimkou uhlíku nebo křemíku se řadí chemie boru k jednomu z nejzajímavějších a nejrozmanitějších [8].

Předpokládá se, že hlavním důvodem pro důležitost tohoto prvku, je jeho schopnost tvorby komplexů [9]. První zmínka o interakci mezi borem a polyoly byla zaznamenána roku 1832 J. B. Biotem [10] v jeho studii, kde prezentoval změnu optické rotace kyseliny vinné za přítomnosti boru. Arylspirocyklické sloučeniny boru byly poprvé připraveny již roku 1878 ze soli bis(salicylato)boratu [4].

Tvorbě komplexů podléhají zejména organické látky obsahující cis-diolové skupiny. V intracelulárním pH se většina boru vyskytuje ve formě kyseliny borité, která se chová jako Lewisova báze a aduje se na amino a hydroxykyseliny, uhlovodíky, nukleotidy a vitamíny [11].

Větší stability esterů se v obou případech dosáhne jejich neutralizací s kationty kovů, přičemž stabilizace je závislá na koncentraci tohoto kationtu [12].

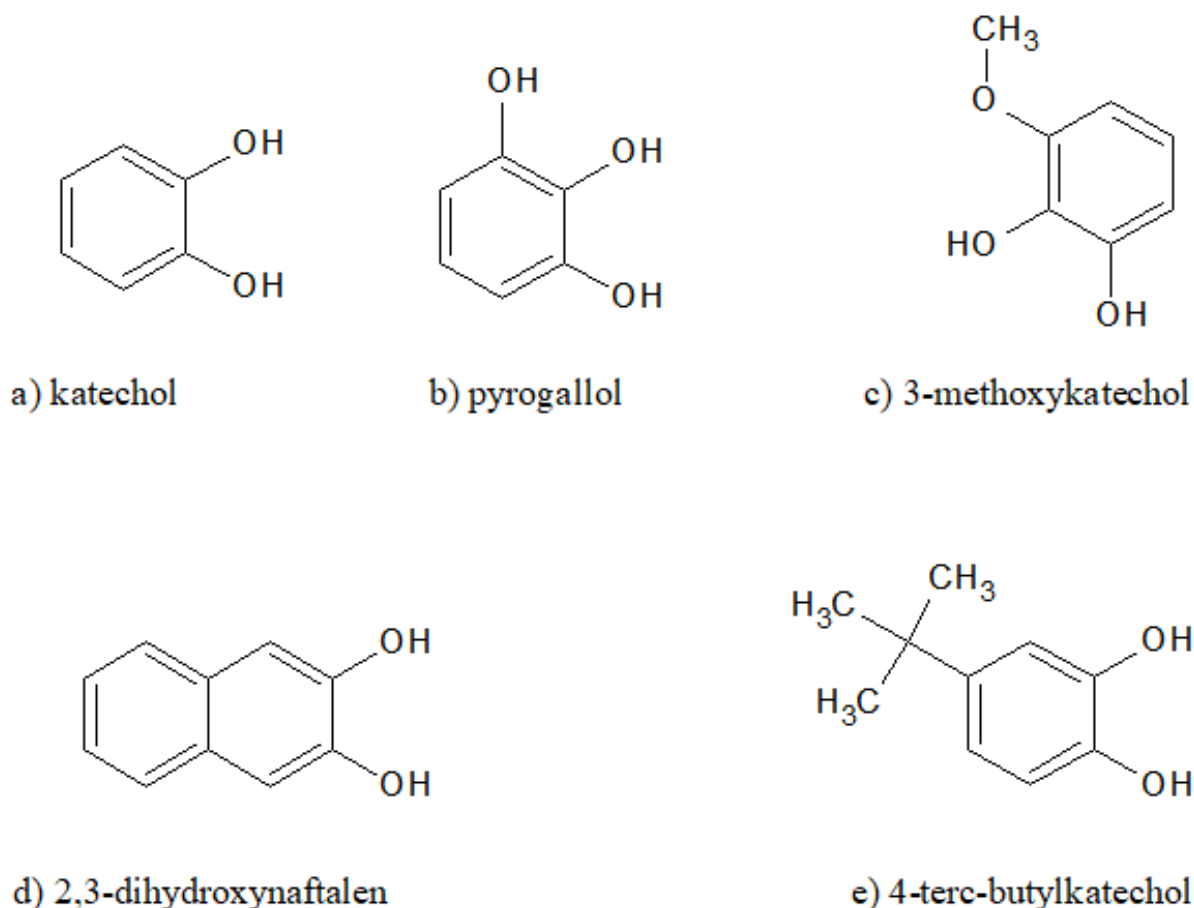
Při tvorbě komplexu boru vznikají kovalentní interakce, které jsou ve vodném roztoku reverzibilní. Vzniklé estery jsou analogy esterů karboxylových. Vnitřní náboj mezi kyselinou boritou a dvojmocným ligandem ve vodném prostředí je závislý na pH. Estery vznikají buďto jako neutrální nebo záporně nabitě. Závislost afinity kyseliny borité a fenyloborité k diolovým sloučeninám zkoumal již roku 1959 J. Lorand [13], a to metodou snižování pH. Experiment byl založen na skutečnosti, že při tvorbě komplexu klesá pKa ve srovnání s pKa kyseliny borité a výsledkem je snížení pH roztoku. Velikost snížení pH je za určitých podmínek úměrná vazebným konstantám. Později byly konstanty ještě několikrát měřeny, ale jejich hodnoty se často lišily. Nedávno bylo zjištěno, že na rovnováhu reakce má vliv i neutrální ester, jehož příspěvek ke konečnému pH nelze zanedbat. Účinek na snižování pH je nejvýraznější u sloučenin, kde jsou vazby v komplexu silné. U vazeb slabých se účinek nevyskytuje nebo je velmi malý. U některých extrémně slabých vazeb je pKa esteru dokonce vyšší než pKa kyseliny borité (například propandiol nebo cyklohexandiol) [14].

Za bazického pH se tedy tvoří nejlépe estery kyseliny borité s dioly, zatímco esterifikace s hydroxykarbonylovými kyselinami probíhá nejlépe v kyselém pH. Ve fyziologickém pH se dobře netvoří ani jeden z komplexů a při silně kyselém pH dochází k jejich štěpení. Pokud je pKa vzniklých esterů nižší než pKa kyseliny borité ($pK_{aB(OH)_3} = 9-10$), chovají se vzniklé neutrální estery jako Lewisova kyselina více než samotná kyselina boritá a jsou preferovány při vyšším pH. Zvýšená koncentrace hydroxidových iontů zajišťuje, že jsou estery boru ve stabilnější tetraedrální formě. Kromě pH je afinita kyseliny borité výrazně ovlivněna povahou a koncentrací pufru, u některých esterů dokonce i při neutrálním pH [14, 15].

Ve své práci jsem se zabývala přípravou komplexů boru za využití fenolických ligandů, která byla již dříve publikována v několika pracích [1-3, 5]. Schéma přípravy arylspirocyklických komplexů je na příkladu použití katecholového ligandu uvedeno na obrázku 1. Tento postup byl analogický pro všechny ligandy, jejichž struktury jsou zobrazeny na obrázku 2.



Obrázek 1 Schéma přípravy arylspiroborátového komplexu s katecholem, podmínky 0,5 ekvivalentu $B(OH)_3$, NaOH, H_2O , 25 °C.



Obrázek 2 Struktury ligandů použitých při přípravě arylspirocyklických sloučenin boru

2. 3. Metabolismus boru a jeho komplexů

Bor je přirozenou součástí přírody. Je esenciálním prvkem pro rostliny a zdá se, že by mohl být důležitým prvkem i pro zvířata a lidi. Přirozený příjem u člověka se pohybuje okolo 1-2 mg na den [16]. Jeho biochemická role u lidí a zvířat není dosud zcela objasněna. Existují dvě hypotézy. První předpokládá, že bor působí hlavně při negativních regulacích tvorbou komplexů s řadou substrátů nebo reagentů s příznivě lokalizovanou hydroxylovou skupinou. Druhá hypotéza, předpokládá, že bor ovlivňuje stabilizační funkci membrány, čímž ovlivňuje i odpověď na působení hormonů, transmembránovou signalizaci nebo transmembránový pohyb kationtů a

aniontů. Tuto hypotézu potvrzuje objev, že bor ovlivňuje transport extracelulárního kalcia a uvolnění intracelulární kalcia u potkaních trombocytů aktivovaných trombinem [17].

Schopnost stabilizace byla prokázána i za přítomnosti ribózy, která se tvoří z běžně dostupných prekurzorů formaldehydu a glykolaldehydu [18]. Zatímco v alkalických podmínkách se rozkládá „browning“ reakcí na směs polymerů již během pár minut, v přítomnosti borátu tvoří stabilní komplex na několik dní. Minerály boru by tedy mohly hrát významnou roli v prebiotickém světě při stabilizaci cyklické ribózy v průběhu syntézy RNA [19].

Několik studií naznačuje, že by se bor mohl podílet v rostlinné buňce na tvorbě struktury buněčné stěny, funkci biomembrán a metabolické aktivitě [9].

Nezbytnost boru se prokázala i pro růst specifických bakterií, jako jsou cyanomycety a aktinomycety rodu *Frankia*. Pro oba druhy mikroorganismů je nezbytný při stabilizaci obalů, které zabraňují přístupu kyslíku v podmínkách fixace N₂. Bor je přítomen ve formě heterocyklických sloučenin ve vnitřní laminové vrstvě vytvořené ze specifických glykolipidů a neutrálních lipidů s velmi vysokým podílem polyhydroxy mastných kyselin nebo alkoholů s dlouhým řetězcem. Všechny tyto složky obsahují volné diolové skupiny, které vážou bor tvorbou komplexů [20].

2. 4. Využití sloučenin boru

Přestože tyto sloučeniny doposud mají pouze omezeného využití, jejich potenciál je velký v mnoha oblastech chemie včetně farmaceutického průmyslu, vědy o materiálech, energetického výzkumu nebo elektroniky.

Sloučeniny boru se v současnosti využívají jako protirakovinná léčiva [21-25], antifungální činidla [2-4, 26]. Slouží pro léčbu akné, psoriázy, periodontal nebo jako antikoagulanty [27]. Rostoucí zájem o sloučeniny boru by mohl vést k vývoji účinných silných terapeutických látek. Využití by mohly nové sloučeniny nalézt v molekulárním zobrazování [28], v biologii kmenových buněk, chemické biologii nebo jako biomarkery [27].

Jedním z významných pokroků je objev Bortezomibu. Jedná se o první případ sloučeniny boru schválené pro klinické testování a v současnosti jeden z nejúčinnějších léků mnohočetného myelomu a non-Hodgkinova lymfomu. Účinnou složkou je kyselina α -aminoboronová, která funguje jako inhibitor proteozomu, čímž se od ostatních protirakovinných léčiv odlišuje [21]. Jedná se o reverzibilní a specifický inhibiční účinek treoninového zbytku proteasomu 26S, který má klíčovou úlohu při řízené regulaci degradace proteinu. Inhibice tohoto enzymu způsobuje nerovnováhu mezi inhibičními a stimulujícími proteiny, které se podílejí na buněčném cyklu, a tím způsobují buněčnou smrt [29]. Vzhledem k tomuto zjištění jsou nyní studovány potenciální

protirakovinné účinky sloučenin boru [1]. Nedávné studie prokázaly, že kyselina boritá má pozitivní cytotoxické a apoptické účinky proti leukemii [22], rakovině prsu [23] a rakovině prostaty [24].

Dalším významným uplatněním je využití sloučenin boru jako činidel při borové záchytové terapii (BNCT). Je to forma radioterapie, při které je pacientovi podán bor 10, který by se měl selektivně vázat na nádorové buňky. Následně se využívá toku neutronů, které interagují s podaným borem za vzniku alfa částic a jader lithia. V současnosti se stále pracuje na vývoji vhodných činidel pro tuto terapii, která vyžaduje jejich nízkou toxicitu, nízký příjem látky zdravou tkání a vysoký příjem tkání nádorovou, důležité je i velmi rychlé vyloučení z krve u zdravých tkání a schopnost zůstat v tkáni nádorové během BNCT. Jako činidla na bázi boru byl klinicky testován například dihydroxyborylový derivát fenylalaninu, boronofenylalanin, borokarpát sodný. Klinický zájem o BNCT se soustředil zejména na léčbu gliomu vyššího stupně, rekurentních nádorů hlavy a krku, melanomu a jaterní metastázy [25].

Bor se využívá i v pozitronové emisní tomografii (PET), která poskytuje unikátní informace o molekulárních a metabolických změnách spojených s onemocněními. Radioaktivní nuklid ^{18}F je optimálním radioizotopem s krátkým poločasem (110 min) využívající se například pro sledování rakoviny. Organoboron se využívá pro zachycení vodného ^{18}F ve formě aryltrifluoroborátu, který je podstatně stabilnější a měl by být užitečný při vývoji stabilních biomolekul pro zobrazování. Trifluorborát se vylučuje poměrně rychle do močového měchýře jako stabilní trifluoro-boritanová sůl. Estery boru jsou potenciálními prekurzory značených činidel (^{18}F)-PET [28].

Na základě interakce kyseliny borité s dvěma cis-hydroxylovými skupinami (sacharidy, glykoproteiny, nukleotidy, nukleosidy) funguje i afinitní chromatografie. Využívá se k separaci glykohemoglobinu (pro dlouhodobé sledování diabetu), lektinů, thymin glykolové DNA a nukleosidů nebo serinových proteáz. Vazby v komplexech jsou reverzibilní, za kyselých podmínek probíhá tedy hydrolyza a původní molekuly se obnovují [30].

Interakce boru s polyoly se využívá i u receptorů pro stanovení glukózy v krvi. Interakce mezi boronovými kyselinami a úzce příbuznými polyoly lze stereoselektivně nebo chemoselektivně rozlišit, což vede k vývoji receptorů pro specifické oligosacharidy, které by mohly nalézt uplatnění v diagnostice rakoviny, infekčních onemocnění nebo stanovení drog [31].

2. 4. 1. Využití se zaměřením na arylspirocyklické sloučeniny boru

Mezi výhody ASB patří jejich nízká cena, snadná příprava, vysoká stabilita termická, chemická ale i elektrochemická. Jsou to sloučeniny netoxické vůči savcům včetně člověka, ale zároveň biologicky aktivní. Byla u nich prokázána aktivita antibakteriální [32] nebo antimykotická [2-4, 26]. Nalezneme u nich i vlastnosti termicidní [3] nebo například fluorescenční [5, 33, 34]. V současnosti jsou sledovány i pro svou protirakovinnou aktivitu.

U vysoce stabilních ASB byla prokázána biortogonalita. Což je schopnost chemicky reagovat v biologických roztocích za fyziologických podmínek, aniž by reakci ovlivňovaly komplexní směsi biologických proteinů nebo dalších malých molekul. Bioortogonalita se využívá pro značení molekul *in vivo* pomocí reportérových skupin. Bioortogonální funkční skupiny se začleňují do biologických molekul a současně jsou reportérové sondy kovalentně připojeny k těmto skupinám [35].

Další využití nacházíme u selektivní boronové optické sondy pro stanovení H_2O_2 , v jehož přítomnosti dochází k deprotekcí boronátu a tvorbě barevného fluorescenčního produktu (ASB). H_2O_2 vzniká v důsledku zvýšené koncentrace reaktivního kyslíku, zvýšená koncentrace bývá spojována s oxidačním stresem nebo různými patologickými stavy jako je rakovina, nebo Alzheimerova choroba [36].

V současné době se testují u těchto sloučenin protinádorové účinky. Známý jsou dosud výsledky například z testování tetrabutylamonných solí ASB odvozených od gallolu, pyrogallolu, a propylgallolu proti karcinomu ledvinových buněk. Jako kontrola byl použit $NBu_4[B(cat)_2]$. Sloučeniny neprokázaly žádnou výraznou protirakovinnou aktivitu. Překvapivé je zjištění, že buňky byly citlivé vůči kontrole. Zároveň nebyl pozorován žádný významný stupeň cytotoxicity v normálních ledvinových buňkách, což naznačuje, že kontrolní sloučenina je selektivní pro rakovinné buněčné linie a nevyvolává nefrotoxicitu v normální tkáni. Většina současných léků jako je cis platina nemají dostatečnou specifitu, což vede k nežádoucím vedlejším účinkům. Vzhledem k výrazným cytotoxickým a apoptickým vlastnostem, byla zkoumána stabilita sloučenin, přičemž nebyl získán žádný důkaz o rozkladu [1].

2. 4. 1. 1. Biologická aktivita

Přestože jsou tyto sloučeniny netoxické, disponují značnou biologickou aktivitou. Vzhledem k tomu, že u některých přírodních a syntetických sloučenin boru byla prokázána antibakteriální, antifungální, antimalarická a antivirotická aktivita, je v současnosti i u ASB biologická aktivita

zkoumána. U značného množství ASB byla již dokonce prokázána a některé substituované sloučeniny vykazují antibakteriální aktivitu srovnatelnou s komerčními antibiotiky [5].

Mechanismus inhibice ASB není dosud znám. Za toxicitu boru vůči mikroorganismům je pravděpodobně zodpovědná schopnost boru tvořit estery s dioly a hydroxykyselinami. Efektivní zánik buněk je zřejmě způsoben spojením borátu s koenzymy, což vede k narušení metabolismu, zároveň borátový anion přímo inhibuje enzymy vazbou na polyoly přítomné v buněčných membránách a narušuje tak buněčnou aktivitu [37].

Antimykobakteriální aktivita vůči *Mycobacterium tuberculosis* byla prokázána u disubstituovaných ASB odvozených od 3,5-di-terc-butylcatecholu a 4-terc-butylcatecholu. Bylo pozorováno, že aktivitu neovlivňoval protion komplexu, ale organoborátový skelet. U těchto sloučenin byla rovněž prokázána antibakteriální aktivita jak proti gramnegativní (*E. Coli*) tak vůči grampozitivním (*S. aureus*) bakteriím [2]. Sloučeniny substituované chlorem vykazují aktivitu dokonce srovnatelnou s komerčními antibiotiky [5]. Antimykobakteriální aktivita byla potvrzena i u ASB odvozených od 2,3-dihydroxynaftalenu. Sloučeniny vykazovaly i mírnou antifungální aktivitu pro *C. albicans*, což potvrzují i další studie. Výsledky odhalily novou třídu sloučenin, která by se v budoucnu mohla využít k tvorbě silnějších a selektivnějších antituberkulózních léků [3]. Antifungální aktivita byla zkoumána i u ASB odvozených od 4-nitrocatecholu, za jejich nízkou aktivitu je pravděpodobně zodpovědná přítomná nitroskupina [4].

V současnosti je ve III. fázi klinických studií testována antifungální aktivita substituovaných ASB pro léčbu kožních a nehtových onemocnění (onychomykóza) [26].

Množství sloučenin obsahující bor včetně ASB má specificky silnou antibakteriální aktivitu proti enterální skupině gram negativních bakterií. V současné době se usilovně pracuje na rozvoji protizánětlivých antibiotik virulentních gram negativních bakterií jako je *Yersinia pestis* (mor) nebo *Bacillus anthracis* (antrax). Dalším případem je ASB vykazující aktivitu proti kmenům *Trypanosoma brucei*, včetně *T. rhodesiense* a *T. gambiense* na zvířecích modelech lidské africké trypanozomiázy. K vyléčení infekce centrální nervové soustavy *T. brucei* došlo po 7 dnech podání u dávky 25 mg/kg perorálně. Studie *in vivo* odhalují, že je sloučenina schopna průchodu přes hematoencefalickou bariéru [32].

Antivirotická aktivita těchto sloučenin byla zkoumána například proti viru hepatitidy C, který je hlavní příčinou chronického onemocnění jater vedoucí k cirhóze, karcinomu nebo selhání jater [38]. Bylo navrženo několik inhibitorů proteáz. Právě cyklické sloučeniny vykazovaly nejslibnější účinnost ve srovnání s lineárními analogy. Pro vývoj léčiv se využívají substituované

difluoridoborátové komplexy pyranonů. Několik sloučenin je v pokročilých fázích klinických studií.

Arylspirocyclické sloučeniny boru vykazují značnou antifungální a termicidní aktivitu. Toto zjištění vedlo ke zkoumání ASB coby potenciálních kandidátů ochrany dřeva. Ačkoliv vykazují jednoduché sloučeniny boru a jeho soli, stejně jako kyselina boritá nebo estery boru jednoduchých alkoholů jistý stupeň ochrany, jejich praktická aplikace je limitována jejich uvolňováním za přítomnosti vlhkosti, zatímco ASB jsou vůči vymývání dřeva rezistentní. Významnými kandidáty jsou amonné ASB, které by mohly nahradit stávající toxické prostředky na bázi arzenu. Ukázalo se, že největší vliv na aktivitu má kation komplexu, který ovlivňuje rozpustnost. Za termicidní aktivitu těchto sloučenin je zřejmě zodpovědná jejich schopnost proniknout do kutikuly termitů nebo jejich nahromadění ve tkáních důsledkem neefektivního eliminačního procesu [3].

2. 4. 1. 2. Fluorescenční vlastnosti

U některých ASB byly objeveny vlastnosti fluorescence. Luminiscenční komplexy nacházejí uplatnění zejména v organických světloemitujících diodách, solárních článcích, jako funkční barviva, fotosenzibilizátory nebo molekulární sondy. Většina fluorescenčních materiálů vykazuje fluorescenci ve zředěných roztocích, ale ve fázi pevné s luminiscencí slabší nebo zanedbatelnou. Fluorescenční organické látky jsou žádoucí pro mnoho technologií jako je chemické snímání, informační zobrazování nebo organickou fotoniku [33]. Organické sloučeniny boru jsou jedny z nejdůležitějších typů fluorescenčních materiálů, které si zasluhují pozornost díky svým luminiscenčním vlastnostem s vysokým kvantovým výtěžkem, velkými Stokesovými posuny nejenom v kapalně, ale i v pevné fázi [34]. V jedné ze studií byla prokázána závislost fluorescence na substituentech (CH_3 , F, Cl a Br), což souvisí s jejich schopností darovat elektrony do aromatického jádra. Nejlepší výsledky prokázal ASB substituovaný methylem [5].

V současnosti se fluorescence u sloučenin boru využívá k přímému zobrazování značených cílů pomocí fluorescenční mikroskopie. Mezi používané fluorescenčně značené proteiny řadíme například dipyrromethen-boron difluorid, jehož derivát se využívá jako fluorescenční sonda k detekci neurofibrilárních proteinů tau, které jsou zodpovědné za Alzheimerovu chorobu [39].

Díky jedinečné elektronové struktuře boru a jeho schopnosti vytvářet kovalentní vazby s uhlíkem je bor široce využíván v syntetické chemii. Částečně v Suzukiho cross coupling reakci [40]. Organické kyseliny boru a estery boru jsou zajímavé pro CC reakci. Snadno se připravují, jsou stabilní ve vodě i na vzduchu. Arylspirocyclické sloučeniny boru byly využívány

jako katalyzátory nebo kokatalyzátory pro Diels-Aderovu reakci [41], methoxykarbonylaci [42] a amidovou nebo esterovou kondenzační reakci [43].

Nedávná studie ukázala, že chirální arylspiroboráty byly používány k odlišení trans-1,2-diaminů a stejně tak pro posuny reagent NMR analýzy trifenylfosforových solí [41]. Lithné soli arylspiroborátů jsou zkoumány pro jejich potencionální využití v lithných bateriích [44].

2. 5. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je metoda, která nám slouží ke stanovení hmotnosti částic, elementárního složení nebo objasnění chemické struktury. Při detekci probíhají tři hlavní děje ionizace v iontovém zdroji, separace iontů v hmotnostním analyzátoru a detekce v detektoru.

2. 5. 1. Ionizace elektrosprejem (ESI – electrospray ionization)

Elektrosprej je poměrně univerzálním typem zdroje ionizace, který nám umožňuje ionizovat středně až silně polární molekuly. Ionizace probíhá díky působení silného elektrického pole. Mobilní fáze s analyty prochází tenkou kovovou kapilárou a vlivem elektrického pole se začne tvořit aerosol, jehož tvorba je podporována zmlžujícím plynem. Rozpouštědlo je odpařováno a povrchový náboj kapiček se zvyšuje. Vlivem narůstajícího Coulombického odpuzování se kapičky rozpadají. Při zmenšení na určitou mez nevede odpuzování k rozpadu, ale začnou se uvolňovat ionty z jejich povrchu do plynné fáze [45].

2. 5. 2. Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)

Tandemové uspořádání se dělí do dvou základních typů. První využívá kombinace hmotnostních analyzátorů, přičemž prostřední hmotnostní analyzátor slouží jako kolizní cela k fragmentaci iontů. Mezi typické uspořádání patří kombinace kvadrupólů (QqQ), kvadrupólů s průletovým analyzátozem (QqTOF). Druhý typ využívá pouze jeden hmotnostní analyzátor a sleduje fragmentaci v závislosti na čase. K tomuto typu řadíme například iontovou past s cyklotronovou rezonancí (ICR) nebo Fourierovou transformaci (FTMS).

V tandemových hmotnostních spektrometrech hmotnostní analyzátor vybere ion ze směsi produkované zdrojem. Ion je následně fragmentován obvykle za pomoci kolizí indukované disociace (CID) a hmotnostní spektrum fragmentovaných iontů je skenováno druhým hmotnostním analyzátozem. První studie v tomto uspořádání byly provedeny při vysokých energiích v řádu keV [50]. Až Yost R. A. a Enke C. G. [46] poprvé publikovali, že ionty mohou být účinně disociovány i při kolizních energiích 10-100 eV.

Technologie a aplikace hmotnostní spektrometrie se neustále rychle vyvíjejí. Během posledních dvou desetiletí byly vyvinuté nové zdroje iontů a nové analyzátory hmotnosti. K tomuto rozvoji výrazně přispěla i tandemová hmotnostní spektrometrie s CID. Vývoj nových systémů tandemového hmotnostního spektrometru, zejména systému trojitých a čtyřnásobných MS/MS, těží z výzkumu základů dynamiky kolize mezi ionty a neutrálními látkami [47].

2. 5. 3. Kolizní indukovaná disociace

Kolizní indukovaná disociace umožňuje přeměnu stabilních iontů vzniklých v iontovém zdroji. K fragmentaci dochází při srážce rychle letícího iontu a neutrální molekuly nejčastěji inertního plynu, a to přeměnou energie kinetické na energii vnitřní.

Pokud může být vnitřní energie fragmentačních iontů ovládána kontrolovaným způsobem, je možné získat rozpadová schémata vyjadřující závislost výtěžku iontů fragmentů na vnitřní energii rozkládajících se iontů. Většina studií iontů využívá nízkou energeticky indukovanou disociaci. V tomto přístupu jsou hmotnostní spektra CID iontů zaznamenávána jako funkce kolizní energie v rozmezí 2 až 50-100 eV. Při těchto nízkých energiích se kinetická energie transformovaná na energii vnitřní zvyšuje tím, že se zvyšuje energie srážková.

Při kolizi rychle letícího iontu se stacionárním cílem (neutrálním terčem), dochází k přeměně kinetické energie iontu na energii vnitřní. Srážka mezi iontem a neutrální látkou je nepružná, kinetická energie iontu se tedy nepřeměňuje zcela, ale dochází k částečné přeměně na translační energii neutrálního plynu. Maximální (těžišťová) energie E_{cm} , která může být takto přeměněna je závislá na hmotnosti jak neutrálního plynu, tak i iontu. Největší je pro kolizi lehkých iontů s těžkým cílem a nejmenší pro kolizi těžkého iontu s lehkým cílem. Zároveň je funkcí kinetické energie vybraného iontu a lze ji vypočítat z následujícího vztahu.

$$E_{cm} = E_{lab} \frac{M_t}{M_i + M_t}$$

kde M_i je hmotnost iontu; M_t je hmotnost terče a E_{lab} je kinetická energie udělená iontu (kolizní energie CE nastavovaná v hmotnostním spektrometru) [47].

3. Experimentální část

3. 1. Přístroje

Pevné sloučeniny byly váženy na analytických váhách Kern ALJ 220-4 (Kern & Sohn, Německo).

Komplexy byly připravovány za využití míchadla Stuart SA8 (Cole-Parmer, UK).

Hmotnostní spektra byla získána na hybridní hmotnostním spektrometru QqTOF compact (Bruker Daltonics, Německo). Dusík použitý jako sušící a rozprašující plyn byl vyroben generátorem dusíku MS-NGM 11 (Bruker Daltonics, Německo).

3. 2. Použité chemikálie

Ligandy použité k přípravě komplexů: 2,3-dihydroxynaftalen (98%), 4-tercbutylcatechol (99%), pyrogallol (99%) a 3-methoxycatechol (99%) byly zakoupeny od firmy Alfa Aesar (Karlsruhe, Německo). Ligand 1,2-dihydroxybenzen byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich (Gillingham, Dorset, UK).

Kyselina boritá (98%) byla dodána firmou Lach-Ner s. r. o. (Neratovice, ČR). Hydroxid sodný (98%) byl zakoupen od PENTA s. r. o. (Praha, ČR).

Jako rozpouštědlo byl použit acetonitril v čistotě pro HPLC, Fisher Scientific UK.

3. 3. Postup

Komplexy kyseliny borité s fenolickými ligandy byly připraveny modifikací postupu podle publikace [22].

Bylo připraveno 0,5 ml 1 mol · dm⁻³ kyseliny borité, ke které byly napipetovány 3 ml roztoku 0,3 mol · dm⁻³ ligandu a 1 ml 0,5 mol · dm⁻³ NaOH. Směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 3 hodin na magnetickém míchadle. Vzorek byl poté naředěn 1:100 acetonitrilem a následně byla měřena hmotnostní spektra.

3. 4. Podmínky měření

Všechna MS spektra byla měřena na přístroji Bruker QqTOF compact v negativním módu za následujících podmínek:

- rozsah skenování m/z 50 až m/z 1000
- tlak zmlžovače 0,3 Bar
- teplota sušícího plynu 220 °C
- průtok sušícího plynu $3,0 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$
- napětí na kapiláře 2800 V

Podmínky CID experimentu:

- šířka izolovaného pásu: 5 Da
- tlak kolizního plynu (N_2): $2,5 \cdot 10^{-3}$ mbar
- rozsah kolizní energie 10 – 200 eV

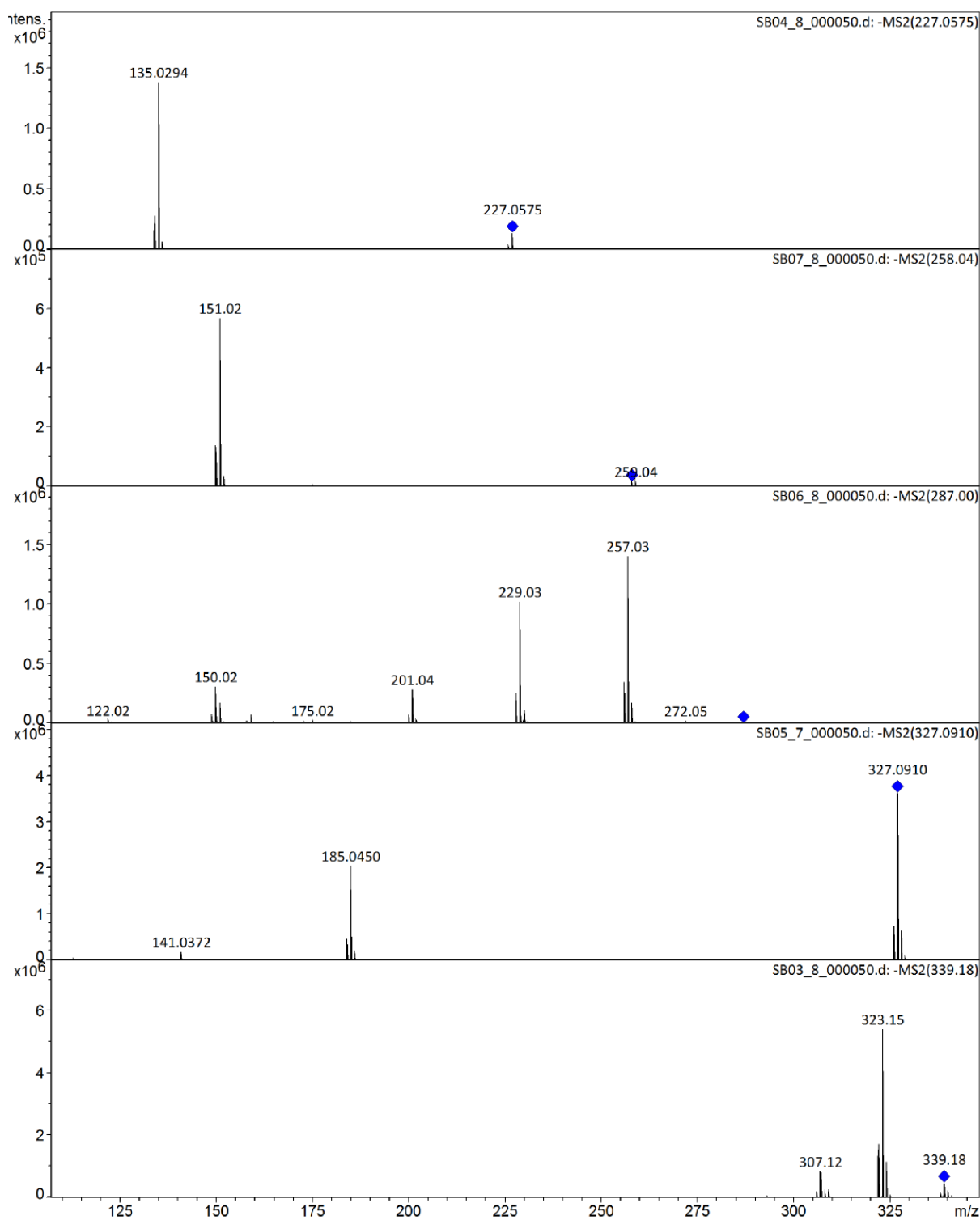
4. Diskuze

Byly připraveny a pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokou rozlišovací schopností (HRMS) charakterizovány komplexy boru s vybranými ligandy. Seznam připravených komplexů s naměřenými daty jsou uvedeny v tabulce 1. Ve všech případech byla konstatována vynikající shoda experimentálně naměřených hodnot m/z s hodnotami teoretickými.

Tabulka 1 Charakterizace připravených komplexů za pomoci HRMS

kód	název	označení	sumární vzorec	měřená (m/z)	teoretická (m/z)	chyba [ppm]
SB04	Bis(1,2-benzenediolato)borate	$[\text{B}(\text{cat})_2]^-$	$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{BO}_4$	227,0532	227,0521	-3,9
SB07	Bis(1,2,3-benzenetriolato)borate	$[\text{B}(\text{PG})_2]^-$	$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{BO}_6$	259,0426	259,0419	-1,7
SB06	Bis(3-methoxy-1,2-benzenediolato)borate	$[\text{B}(\text{MEC})_2]^-$	$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{BO}_6$	287,0744	287,0735	-3,1
SB05	Bis(2,3-naphtalenediolato)borate	$[\text{B}(\text{DHN})_2]^-$	$\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{BO}_4$	327,084	327,0834	-0,6
SB03	Bis(4-tert-Butyl-1,2-dihydroxybenediolato)borate	$[\text{B}(\text{TBC})_2]^-$	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{BO}_4$	339,1777	339,1773	0,0

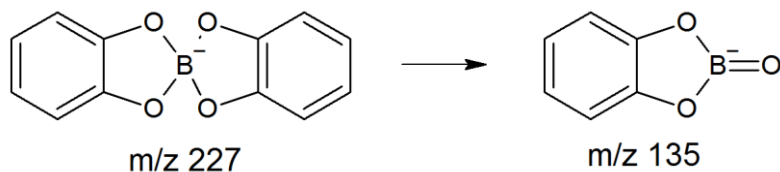
Připravené komplexy byly podrobeny fragmentaci v kolizní cele, kdy laboratorní kolizní energie **CE** byla postupně zvyšována po 1 eV v intervalu 10 – 200 eV. U všech iontů obsahujících bor byl registrován charakteristický izotopový profil odpovídající přirozenému zastoupení izotopů boru $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ v poměru 20% / 80%. Tento charakteristický profil izotopů byl využit i pro identifikaci fragmentových iontů, a proto byly prekurzní ionty izolovány v intervalu širokém 5 Da. MS/MS spektra všech komplexů zaznamenaná při hodnotě **CE** 50 eV jsou na obrázku 3.



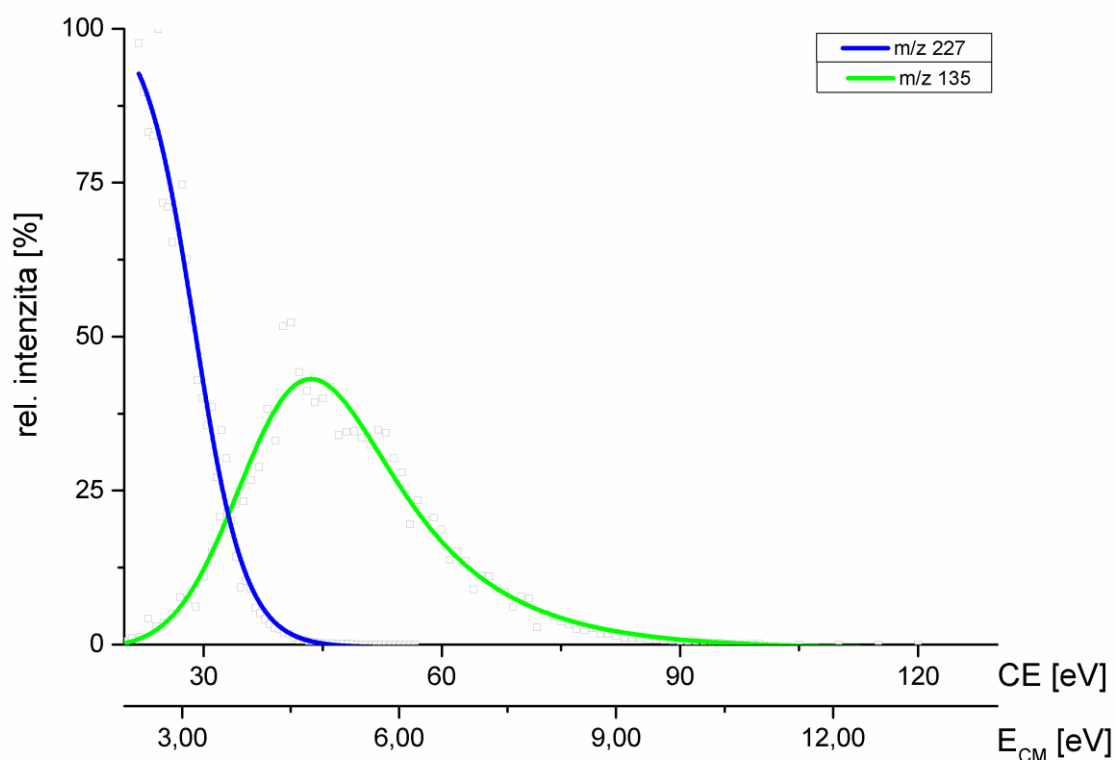
Obrázek 3 Fragmentační spektra arylspiroborátových komplexů zaznamenané při laboratorní kolizní energii CE 50 eV.

Nejjednodušší ze všech komplexů byla interpretace hmotnostního spektra u komplexu $[B(\text{Cat})_2]^-$. V tomto případě vznikl odstoupením celého ligandu prakticky jediný fragment

m/z 135. Na obrázku 3 je toto spektrum pod kódem SB04. Schematicky tuto fragmentaci vystihuje obrázek 4 a průběh CID experimentu je na obrázku 5.



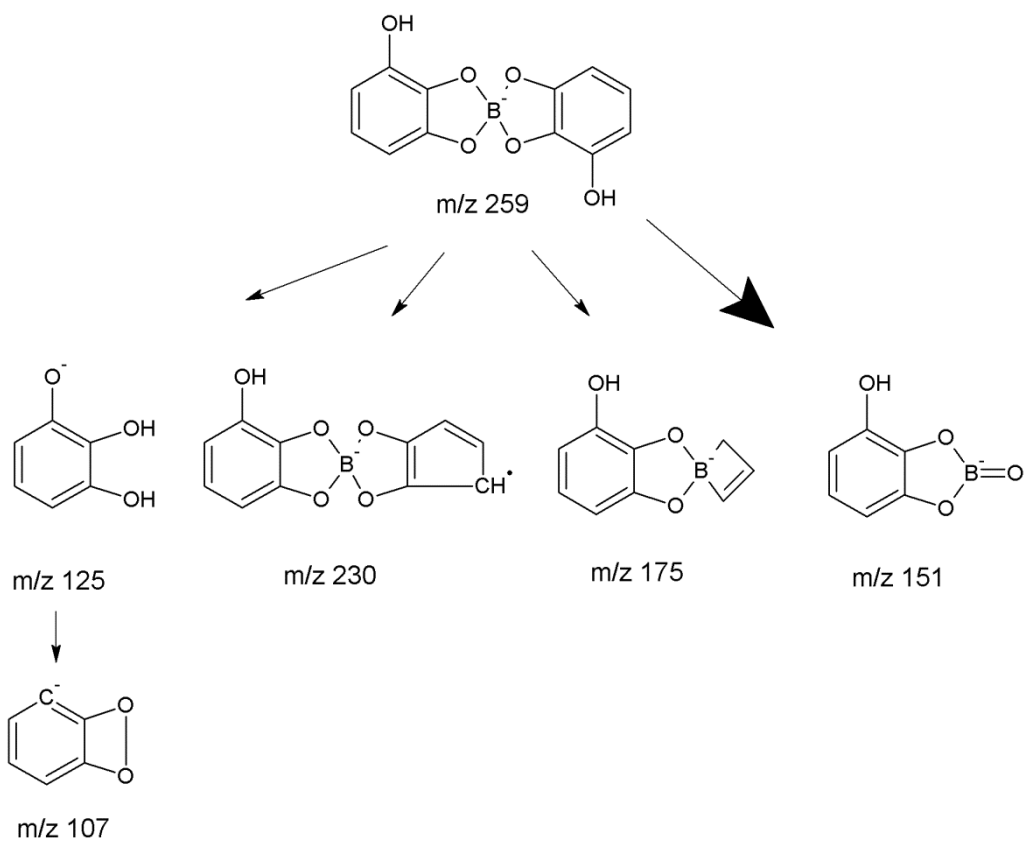
Obrázek 4 Fragmentační schéma komplexu $[B(\text{Cat})_2]^-$



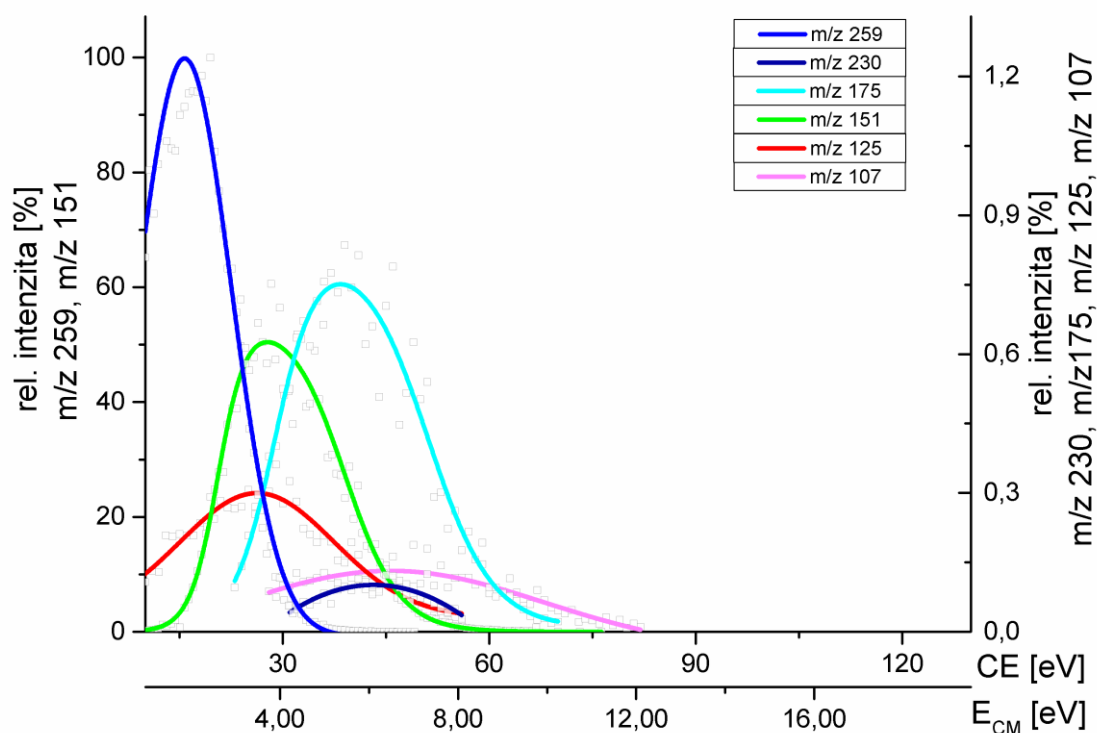
Obrázek 5 Graf závislosti relativní intenzity iontů vzniklých fragmentací $[B(\text{Cat})_2]^-$ na kolizní CE resp. E_{CM}

Poněkud zajímavější mechanismus fragmentace byl zaznamenán u komplexu s pyrogalolem $[B(\text{PG})_2]^-$. Na obrázku 3 je toto spektrum pod kódem SB07. Na první pohled je zde patrná daleko nižší provázanost struktur ve srovnání s ostatními studovanými komplexy. V MS/MS spektru podle očekávání dominuje iont m/z 151 vzniklý ztrátou celého ligandu, jak to bylo již pozorováno ve spektru katecholového komplexu. Kromě tohoto majoritního píku byl zaznamenán ještě pík m/z 175, jehož relativní intenzita však nepřekročila 1 %. S ještě nižší intenzitou byl pozorován také iont s lichým počtem elektronů m/z 230 a dále dvojice iontů

odpovídající pyrogallolu m/z 125 a jeho fragmentu m/z 107. U těchto iontů na rozdíl od všech ostatních pochopitelně nebyl zaznamenán izotopový profil typický pro atom boru vyznačující se přítomností izotopu ^{10}B s přirozeným zastoupením 25%. Popsaný fragmentační mechanismus shrnuje schéma na obrázku 6 a průběh CID experimentu je na obrázku 7.

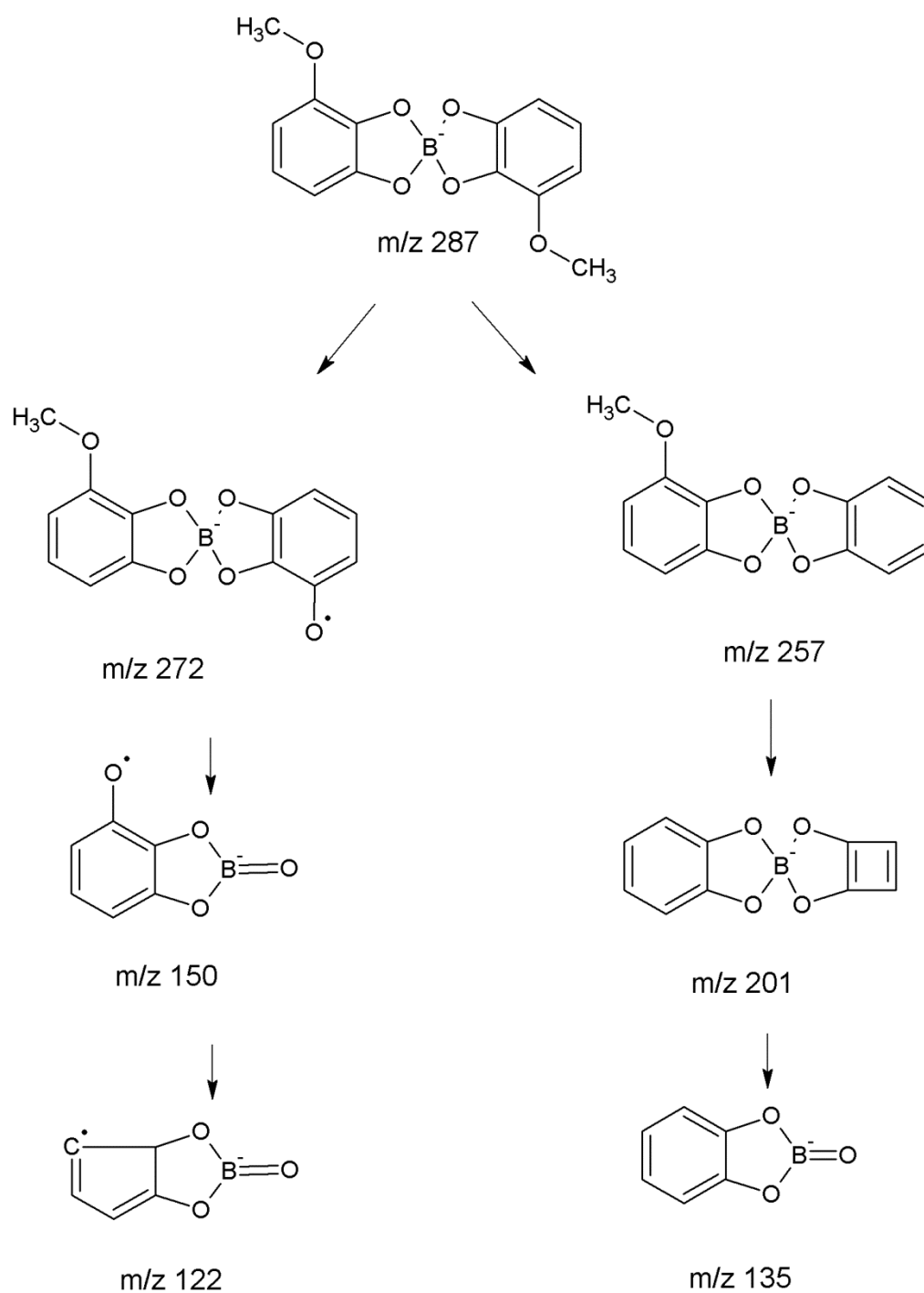


Obrázek 6 Fragmentační schéma komplexu $[B(PG)_2]^-$



Obrázek 7 Graf závislosti relativní intenzity iontů vzniklých fragmentací $[B(PG)_2]^-$ na kolizní CE resp. E_{CM}

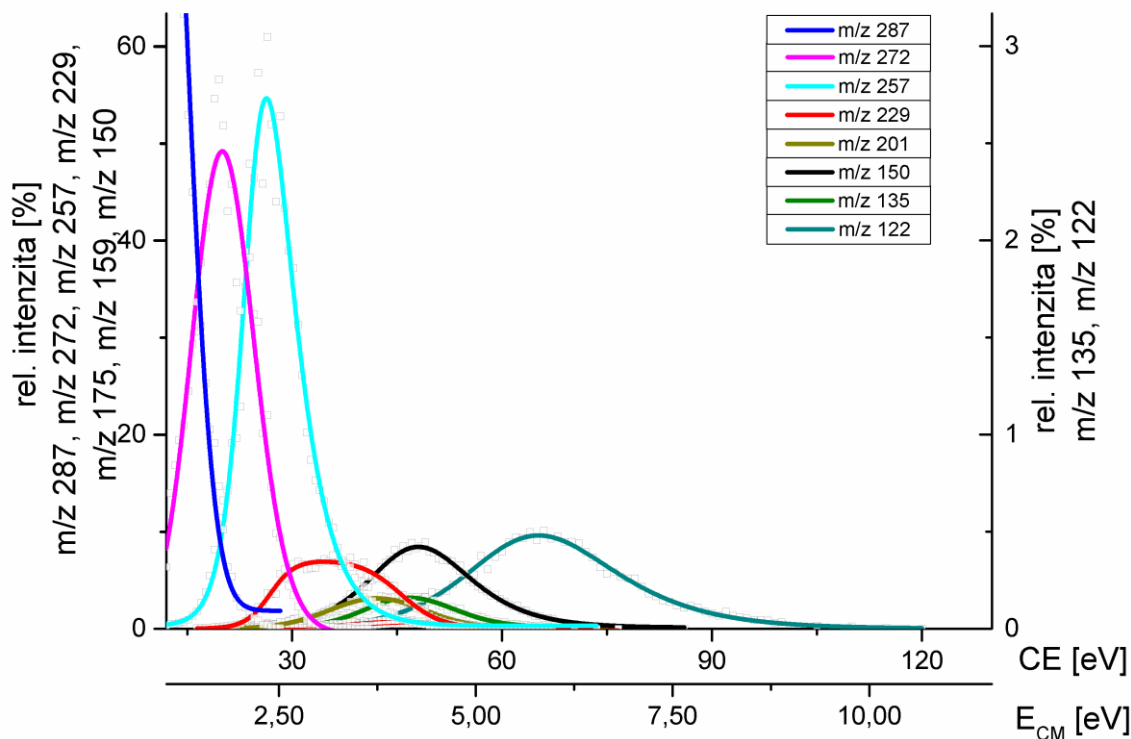
Velmi odlišné chování bylo v kolizní cele pozorováno u komplexu $[B(MEC)_2]^-$. Na obrázku 3 je toto spektrum pod kódem SB06. Izolovaný aniont m/z 287 se pravděpodobně fragmentuje dvěma odlišnými mechanismy, jak je naznačeno na obrázku 8, kde na jedné straně registrujeme fragmentaci obvyklou u iontů se sudým počtem elektronů. To znamená, že v prvním kroku dochází k odštěpení molekuly formaldehydu za vzniku fragmentu m/z 257. Potom následuje paralelní odstoupení formaldehydu z druhého ligandu a etylénu z aromatického kruhu, což vede ke vzniku fragmentu m/z 201. Při dalším zvyšování kolizní energie končí tato větev iontem m/z 135, který byl pozorován rovněž mezi fragmenty katecholového komplexu. Bohužel se zatím nepodařilo žádným racionálním způsobem vysvětlit vznik poměrně výrazného fragmentu m/z 229, což bude předmětem dalšího zkoumání.



Obrázek 8 Fragmentační schéma komplexu $[\text{B}(\text{MEC})_2]^+$

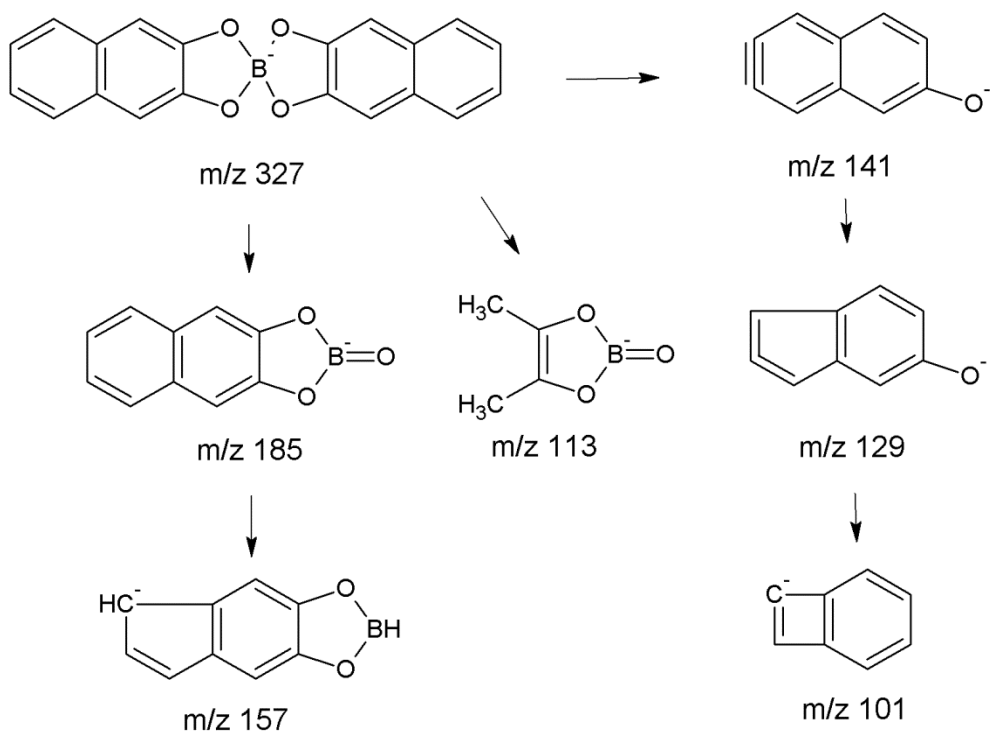
Kromě popsanych iontů se ve spektru vyskytuje řada iontů se sudou hmotností, což by naznačovalo, že se s největší pravděpodobností jedná o ionty s lichým počtem elektronů (radikály). První z nich vzniká odštěpením methylového radikálu za tvorby iontu $\text{m/z } 272$. Je nutné poznamenat, že tento mechanismus je v rozporu s pravidlem sudých elektronů. Dalším odstoupením celého 3-methoxy catecholového ligandu získáme iont $\text{m/z } 150$, který následně

po odstoupení oxidu uhelnatého poskytuje iont m/z 122. Popsaný fragmentační mechanismus naznačuje průběh CID experimentu na obrázku 9.

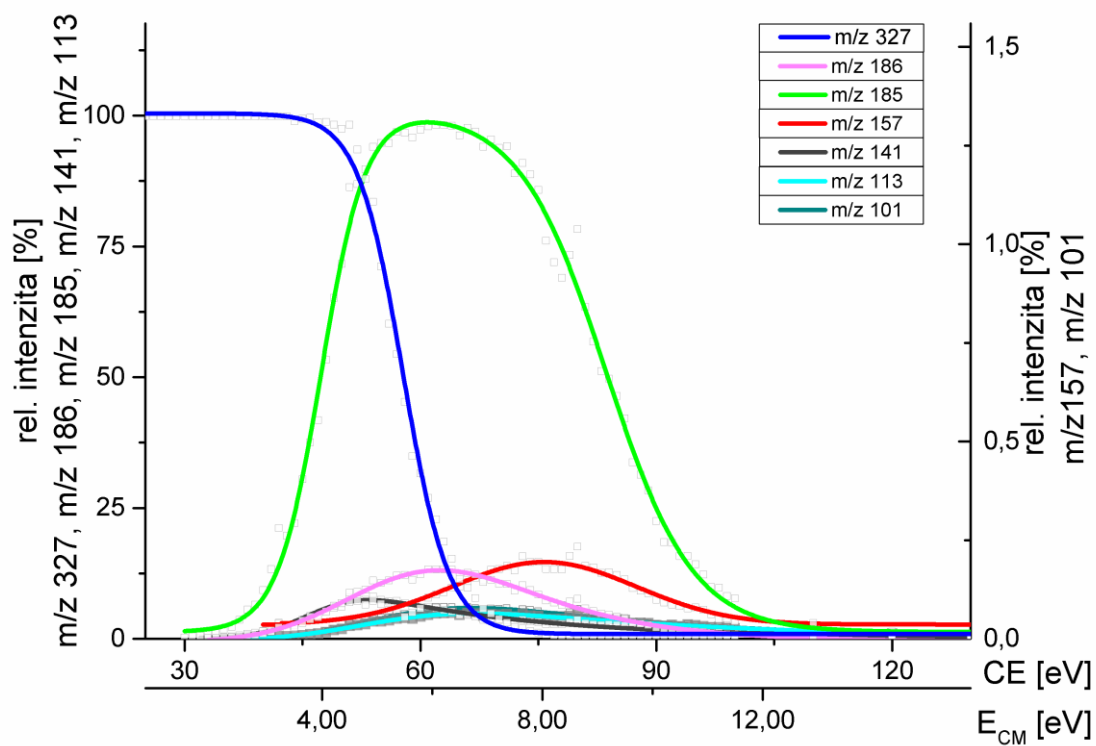


Obrázek 9 Graf závislosti relativní intenzity iontů vzniklých fragmentací $[B(MEC)_2]$ na kolizní CE resp. E_{CM}

U fragmentačního mechanismu komplexu s 2,3-dihydroxynaftalenem $[B(DHN)_2]^+$, jehož spektrum na obrázku 3 najdeme pod kódem SB05, bylo možné sledovat dvě prakticky rovnocenné cesty. Jedna obvyklá probíhala přes eliminaci celého ligandu za vzniku iontu m/z 185 až po ztrátu oxidu uhelnatého spojenou se zmenšením jednoho z aromatických cyklů a tvorbou iontu m/z 157. Druhá cesta vycházela z fragmentace samotného ligandu a tudíž ionty m/z 141; m/z 129 a m/z 101 nemají už izotopový profil charakteristický pro přítomnost boru. Poněkud obtížněji interpretovatelný je vznik fragmentu m/z 113, ale jeho intenzita je celkem nevýznamná. Popsaný fragmentační mechanismus shrnuje schéma na obrázku 10 a průběh CID experimentu je na obrázku 11.

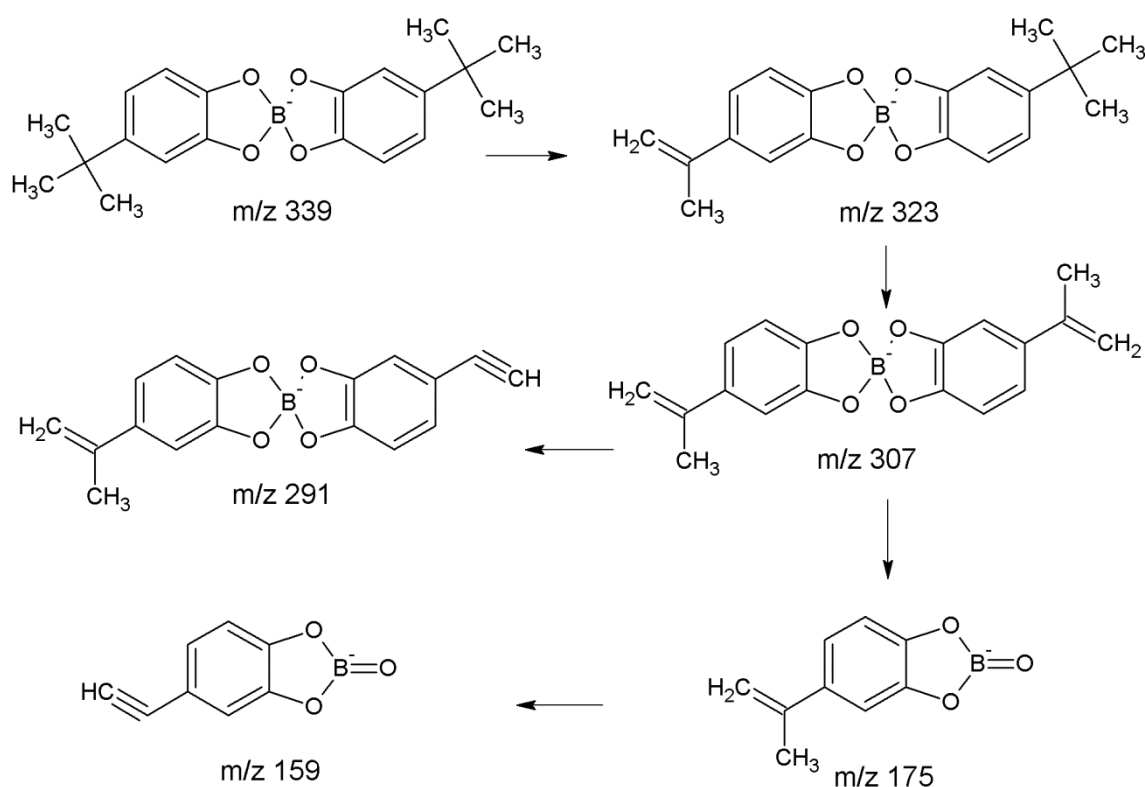


Obrázek 10 Fragmentační schéma komplexu $[B(DHN)_2]$



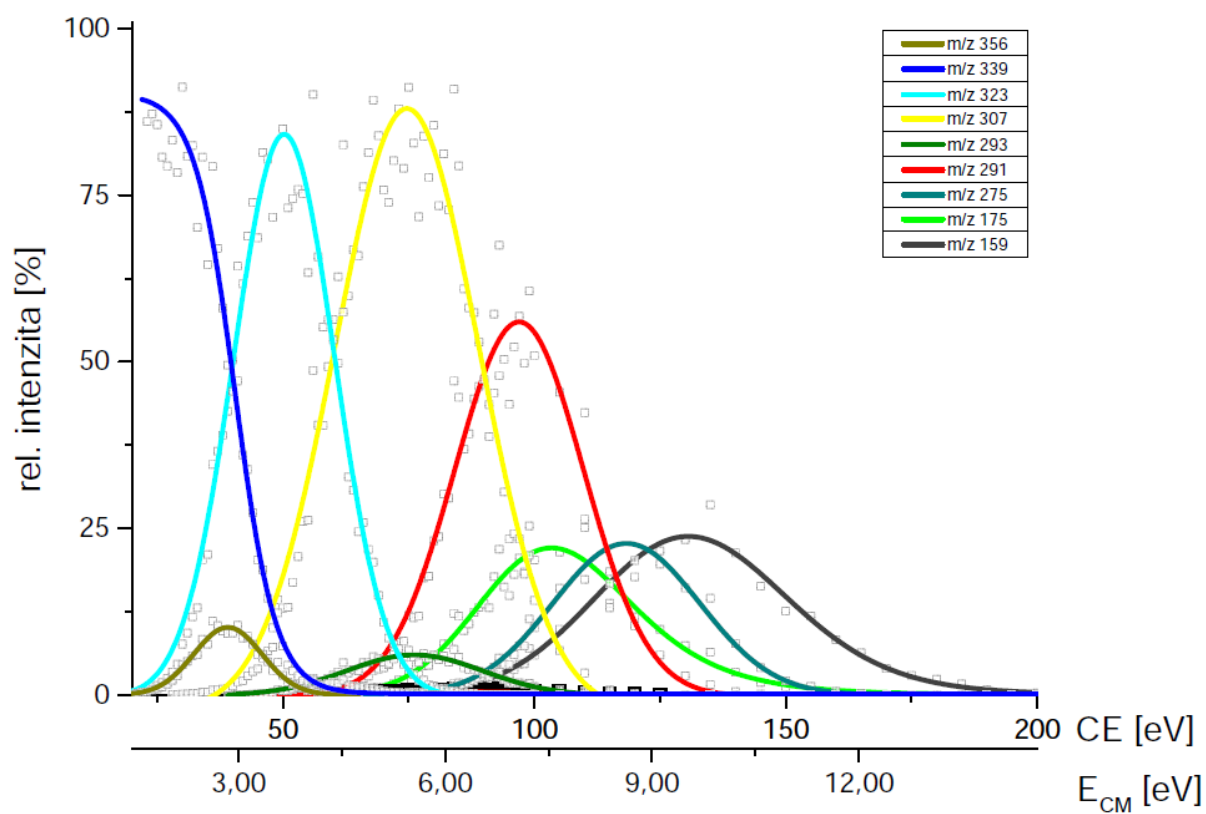
Obrázek 11 Graf závislosti relativní intenzity iontů vzniklých fragmentací $[B(DHN)_2]$ na kolizní CE resp. E_{CM}

U komplexu $[B(TBC)_2]^-$, jehož spektrum na obrázku 3 nese kód SB03, byla pozorována výrazná stabilizace fragmentů odštěpováním molekuly metanu z tercbutylových skupin. Odstoupením jedné molekuly CH_4 vzniká z molekulárního iontu fragment m/z 323. Obdobný proces následuje na druhém tercbutylu při dalším zvyšování kolizní energie za vzniku iontu m/z 307. Při navýšení E_{CM} nad 6 eV odstupuje další molekula metanu za vzniku dalšího velmi intenzivního iontu m/z 291. Prakticky společně s tímto iontem vzniká fragment m/z 175, což je obdoba iontu $L-B=O$, který je ale zmenšený ztrátou molekuly metanu. Z tohoto iontu se při energii na 9 eV tvoří odštěpením další molekuly metanu iont m/z 159. Popsané fragmentační schéma je na obrázku 12.



Obrázek 12 Fragmentační schéma komplexu $[B(TBC)_2]^-$

Navržená interpretace fragmentačního mechanismu vychází z analýzy průběhu CID experimentu, jehož záznam je na obrázku 13.



Obrázek 13 Graf závislosti relativní intenzity iontů vzniklých fragmentací $[B(TBC)_2]$ na kolizní CE resp. E_{CM}

5. Závěr

Byly úspěšně připraveny a pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS) charakterizovány arylspiroborátové komplexy s pěti různými ligandy. Studium chování těchto komplexů v kolizní cele ani interpretaci takto získaných hmotnostních spekter se doposud nikdo systematicky nevěnoval. V tomto smyslu přináší práce množství nových dosud nepublikovaných poznatků.

Komplex Bis(3-methoxy-1,2-benzenediolato)borate nebyl doposud nikým syntetizován a jedná se tedy o nově připravenou látku, která může mít velmi zajímavé vlastnosti, jak naznačily experimenty v kolizní cele.

6. Použitá literatura

- [1] Cormier K., Curry D. R., Betsch M. P., Goguen J. A., Vogels C. M., Decken A., Turcotte S. a Westcott S. A.: „Synthesis, Characterization, and Anticancer Activities of Pyrogallo-Based Arylspiroborates.“ *Journal of Heterocyclic Chemistry* 53:6, 1807–12 (2006).
- [2] Webb M. I., Halcovitch N. R., Bowes E. G., Lee G. M., Geier M. J., Vogels C. M., O'Neill T., Li H. X., Flewelling A., Decken A., Gray C. A., Westcott S. A.: „Arylspiroborates Derived from 4- tert- Butylcatechol and 3,5- Di- tert- butylcatechol and Their Antimicrobial Activities.“ *Journal of Heterocyclic Chemistry* 51:1, 157–61 (2013).
- [3] Geier M. J., Bowes E. G., Lee G. M., Li H. X., O'Neill T., Flewelling A., Vogels C. M., Decken A., Gray C. A. a Westcott S.: „Synthesis and Biological Activities of Arylspiroborates Derived from 2,3-Dihydroxynaphthalene.“ *Heteroatom Chemistry* 24:2, 116-123 (2013).
- [4] Mosseler J. A., Melanson J. A., Bowes E. G., Lee G. M., Vogels C. M., Baerlocher F. J., Decken A. a Westcott S. A.: „Synthesis, characterization and antifungal studies of arylspiroborates derived from 4-nitrocatechol.“ *Journal of Molecular Structure* 1002:1, 24-27 (2011).
- [5] Wang Q. a Zhou H.: „Ammonium Arylspiroborate Compounds: Synthesis, Crystal Structure, Fluorescence Properties, and Antibacterial Activity.“ *Organometallics* 36:17, 3293-3303 (2017).
- [6] Okamoto Y., Takei Y. a Takagi K.: „Studies on Spiroborate Complexes .2. Structural Elucidation of Biscatechol Spiroborate and Its Analogs by NMR and MS Spectroscopy.“ *Polyhedron* 6:12, 2119-2128 (1987).
- [7] Tahara K., Akita T., Katao S. a Kikuchi J.: „Construction of Di- and Tetra-Ferrocenyl Spiroborate Complexes from Catechol Building Blocks and Their Redox Behaviors.“ *Dalton Transactions* 43:3, 1368-1379 (2014).
- [8] Greenwood N. N. a Earnsha A.: Boron. In: *Chemistry of the Elements*. Butterworth-Heinemann (2th ed.), New York, Pergamon Press, 1997, p. 139.

- [9] Bolaños L., Lukaszewski K., Bonilla I. a Blevins D.: „Why Boron?“ *Plant Physiology and Biochemistry* 42:11, 907-912 (2004).
- [10] Lowry M. T.: *Hydroxy-Acids. In Optical Rotatory Power*, Longmans Green and Company, New York, Dover Publications, 1935 p. 286.
- [11] Ferrier, Robert J.: „Carbohydrate Boronate,“ *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 35, 31-80 (1978).
- [12] Bishop M., Bott S. G. a Andrew R. B.: “Structural Characterization of Borate Esters in Which Sodium Acts as a Support to the Structural Framework.” *Journal of the Chemical Society* 0:18, 3100–3105 (2000).
- [13] Lorand J. P. a Edwards J. O.: „Polyol Complexes and Structure of the Benzeneboronate Ion.” *Journal of Organic Chemistry* 24:6, 769–74 (1959).
- [14] Springsteen G. a Wang B.: „A Detailed Examination of Boronic acid–diol Complexation.“ *Tetrahedron* 58:26, 5291-5300 (2002).
- [15] Yasuda M., Yoshioka S., Yamasaki S., Somyo T., Chiba K. a Baba A.: „Cage-Shaped Borate Esters with Enhanced Lewis Acidity and Catalytic Activity.“ *Organic Letters* 8:4, 761-764 (2006).
- [16] Hunt C. D.: „Dietary Boron: Progress in Establishing Essential Roles in Human Physiology.“ *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 26:2–3, 157–60 (2012).
- [17] Thippagowda P. B., Singh V., Sundivakkam P. C., Xue J. M., Asrar B., Tiruppathi C.: „Ca²⁺ Influx via TRPC Channels Induces NF-KappaB-Dependent A20 Expression to Prevent Thrombin-Induced Apoptosis in Endothelial Cells.“ *American Journal of Physiology* 298:3, C656-664 (2010).
- [18] Breslow R.: „On the Mechanism of the Formose Reaction.“ *Tetrahedron Letters* 1:21, 22-26 (1959).
- [19] Ricardo, A., Carrigan M. A., Olcott A. N. a Benner S. A.: „Borate Minerals Stabilize Ribose.“ *Science* 303:5655, 196-196 (2004).
- [20] Berry A. M., Moreau R. A. a Jones A. D.: „Bacteriohopanetetrol-Abundant Lipid in *Frankia* Cells and in Nitrogen-Fixing Nodule Tissue.“ *Plant Physiology* 95:1, 111–15 (1991).

- [21] Baker S. J., Ding Ch. Z., Akama T., Zhang Y. K., Hernandez V. a Xia Y.: „Therapeutic Potential of Boron-containing Compounds.“ *Future Medicinal Chemistry* 1:7, 1275-88 (2009).
- [22] Canturk Z., Tunali Y., Korkmaz S. a Zafer G.: „Cytotoxic and Apoptotic Effects of Boron Compounds on Leukemia Cell Line.“ *Cytotechnology* 68:1, 87-93 (2014).
- [23] Scorei R., Ciubar R., Ciofrangeanu C. M., Mitran C. M., Cimpean A. a Iordachescu D.: „Comparative Effects of Boric Acid and Calcium Fructoborate on Breast Cancer Cells.“ *Biological Trace Element Research* 122:3, 197–205 (2008).
- [24] Gallardo W., Maria T., Maronpot R. R., Wine R. N., Brunssen S. H. a Chapin R. C.: „Inhibition of the Enzymatic Activity of Prostate-Specific Antigen by Boric Acid and 3-Nitrophenyl Boronic Acid.“ *The Prostate* 54:1, 44–49 (2003).
- [25] Barth R. F., Vicente M. G., Harling O. K., Kiger W. S., Riley K. J., Binns P. J., Wagner F. M., Suzuki M., Aihara T, Kato I.: „Current Status of Boron Neutron Capture Therapy of High Grade Gliomas and Recurrent Head and Neck Cancer.“ *Radiation Oncology* 7:146 (2012).
- [26] Gupta A. K. a Simpson F. C.: „New Therapeutic Options for Onychomycosis.“ *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 14:1, 149-149 (2012)
- [27] Bhaskar C. D., Pritam T., Karki R., Schinke C., Das S., Kambhampati S., Banerjee S. K., Veldhuizen P., Amit V., Weiss L. M. a Evans T.: „Boron Chemicals in Diagnosis and Therapeutics.“ *Future Medical Chemistry* 5:6, 653-676 (2013).
- [28] Ting R., Harwig C., Keller C., McCormick S., Austin P., Overall C. M., Adam J. M., Ruth T. J. a Perrin D. M.: „Toward [18F]-Labeled Aryltrifluoroborate Radiotracers: In Vivo Positron Emission Tomography Imaging of Stable Aryltrifluoroborate Clearance in Mice.“ *Journal of the American Chemical Society* 130:36, 12045–55 (2008).
- [29] Adams J., Palombella V. J., Sausville E. A., Johnson J., Destree A., Lazarus D. D., Mass J., Pien C. S., Prakash S. a Elliott P. J.: „Proteasome Inhibitors: A Novel Class of Potent and Effective Antitumor Agents.“ *Cancer Research* 59:11, 2615–22 (1999).

- [30] Fossey J. S., D’Hooge F., Elsen J. M. H., Pereira Morsais M. P., Pascu S. I., Bull S. D., Marken F., Jenkins A. Toby A., Jiang Y. B. a James Tony D.: „The Development of Boronic Acids as Sensors and Separation Tools.“ *The Chemical Record* 12:5, 464–78 (2012).
- [31] Hageman, J. H. a Kuehn G. D.: „Boronic Acid Matrices for the Affinity Purification of Glycoproteins and Enzymes.“ *Methods in Molecular Biology* 11, 45–71 (1992).
- [32] Robert J. T., Nare B., Wring S. A., Orr M. D., Chen D., Sligar J. M., Jenks M. X., Noe R. A., Bowling T. S., Mercer L. T. Rewerts C., Gaukel E., Owens J., Parham R., Randolph R., Beaudet B., Bacchi C. J., Yarlett N., Plattner J. J., Frend Y., Ding C., Akama T., Zhang Y. K., Brun R., Kaiser M., Scandale I., Don R.: „SCYX-7158, an Orally-Active Benzoxaborole for the Treatment of Stage 2 Human African Trypanosomiasis.“ *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5:6, 1151-1151 (2011).
- [33] Kubota Y., Tsuzuki T., Funabiki K., Ebihara M. a Matsui M.: „Synthesis and Fluorescence Properties of a Pyridomethene–BF₂ Complex.“ *Organic Letters* 12:18, 4010–13 (2010).
- [34] Kolpaczynska M., DeRosa C. A., Morris W. A. a Fraser C. L.: „Thienyl Difluoroboron β -Diketonates in Solution and Polylactide Media.“ *Australian journal of chemistry* 69:5, 537-45 (2006).
- [35] Shin S. B., Almeida R. D., Gerona-Navarro G., Bracken C. a Jaffrey S. R.: „Assembling Ligands in Situ Using Bioorthogonal Boronate Ester Synthesis.“ *Chemistry & Biology* 17:11, 1171–76 (2010).
- [36] Chang M. C. Y., Pralle A., Isacoff E. I. a Chang C. J.: „A Selective, Cell-Permeable Optical Probe for Hydrogen Peroxide in Living Cells.“ *Journal of the American Chemical Society* 126:47, 15392–93 (2004).
- [37] Hicks J. W., Kyle C. B., Vogels C. M., Wheaton S. L., Baerlocher F. L., Decken A. a Westcott S. A.: „Synthesis, Characterization, and Antifungal Activity of Boron-Containing Thiosemicarbazones.“ *Chemistry & Biodiversity* 5:11, 2415–22 (2008).
- [38] Zoulim, F., Chevallier M., Maynard M. a Trepo C.: „Clinical Consequences of Hepatitis C Virus Infection.“ *Reviews in Medical Virology* 13:1, 57–68 (2013).

- [39] Ojida A., Sakamoto T., Inoue M., Fujishima S., Lippens G. a Hamachi I.: „Fluorescent BODIPY-Based Zn(II) Complex as a Molecular Probe for Selective Detection of Neurofibrillary Tangles in the Brains of Alzheimer’s Disease Patients.“ *Journal of the American Chemical Society* 131:18, 6543–48 (2009).
- [40] Kotha S., Kakali L. a Dhurke K.: „Recent Applications of the Suzuki-Miyara Cross-Coupling Reaction in Organic Synthesis.“ *Tetrahedron* 58:48, 9633-9695 (2002).
- [41] Kelly T. R., Whiting A. a Chandrakumar N. S.: „A Rationally designed, chiral Lewis acid for the asymmetric induction of some Diels-Alder reactions.“ *Journal of the American Chemical Society* 108:12, 3510–12 (1986).
- [42] Vieira T. O., Green M. J. a Alper H.: „Highly Regioselective Anti-Markovnikov Palladium Borate Catalyzed Methoxycarbonylation Reactions: Unprecedented Results for Aryl Olefins.“ *Organic Letters* 8:26, 6143–45 (2006).
- [43] Maraš N. a Kočevár M.: „Boric Acid- Catalyzed Direct Condensation of Carboxylic Acids with Benzene- 1,2- diamine into Benzimidazoles.“ *Helvetica Chimica Acta* 94:10, 1860-74 (2011).
- [44] Jankowski, P., Wieczorek W. a Johansson P.: „New Boron Based Salts for Lithium-Ion Batteries Using Conjugated Ligands.“ *Physical Chemistry Chemical Physics* 18:24, 16274–80 (2016).
- [45] Friedecký D. a Lemr K.: “Úvod do hmotnostní spektrometrie.” *Klinická biochemie a metabolismus* 20:41, 152 – 157 (2012).
- [46] Yost R. A. a Enke C. G.: “Selected Ion Fragmentation with a Tandem Quadrupole Mass Spectrometer.” *Journal of the American Chemical Society* 100:7, 2274-2275 (1978).
- [47] Douglas D. J.: „Applications of Collision Dynamics in Quadrupole Mass Spectrometry.“ *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 9:2, 101-113 (1998).